

Eixo Temático: Biologia Aplicada

ET-09-002

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Streptomyces* sp. G-27 CONTRA MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

Hanna Katarina Lopes Ferreira¹, Suellen Emilliany Feitosa Machado¹, Raphael Carlos Ferrer de Santana¹, Luiz Eduardo Felix de Albuquerque¹, Isllan D'Eric Gonçalves da Silva¹, Glêzia Renata da Silva-Lacerda^{1,2}, Janete Magali de Araújo¹, Gláucia Manoella de Souza Lima¹

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos, PE.

²Faculdade Maurício de Nassau, Unidade Caruaru, PE.

<http://dx.doi.org/10.21472/congrebio2016.et-09-002>

RESUMO

Actinobactérias ou actinomicetos são bactérias filamentosas Gram-positivas normalmente isoladas do solo e que constituem um dos maiores filos bacterianos. Possuem grande potencial biotecnológico, pois são reconhecidamente produtoras de enzimas, pigmentos, substâncias com ações antibiótica, antitumoral, anti-helmíntica e antifúngica, entre outros. Apesar da resistência aos antimicrobianos ser considerada um fenômeno natural de adaptação dos micro-organismos às drogas, o surgimento de cepas resistentes conduz à ineficácia da terapia medicamentosa. A resistência antimicrobiana é encarada como desafio e, nesse contexto, a exploração dos produtos naturais apresenta-se como alternativa para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos e, conseqüentemente, para o combate a esse tipo de resistência. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano da cepa *Streptomyces* sp. G-27 frente a micro-organismos de interesse clínico. O micro-organismo foi cultivado em ágar ISP-2, a 37 °C, durante 120 horas. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em bloco de gelose, medindo 8 x 8 mm de diâmetro, frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura. Para estes micro-organismos, foram preparadas suspensões com densidade de 0,5, da Escala de McFarland, que foram semeadas em placas contendo Ágar Mueller Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud para a levedura. Os blocos de gelose foram colocados sobre as placas inoculadas, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e a 30 °C por 48 horas para a levedura. O ensaio foi realizado em triplicata. Após o período de cultivo, o diâmetro dos halos foi medido e os resultados foram obtidos pela média aritmética das triplicatas. *Streptomyces* sp. G-27 apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*. Observou-se que a actinobactéria testada possui atividade antimicrobiana contra cinco dos seis micro-organismos teste utilizados, revelando perspectivas sobre o potencial biotecnológico de tal microrganismo, que foi isolado de uma região de microbiota pouco explorada.

Palavras-chave: *Streptomyces* sp.; Metabólitos secundários; Atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas que constituem um dos maiores filos bacterianos. São seres ubíquos, sendo encontrados em ambientes aquáticos e terrestres. Apresentam organização micelial, possuem um extenso metabolismo secundário e produzem cerca de dois terços de todos os antimicrobianos derivados da natureza, além de substâncias com ações antitumorais, anti-helmínticas e antifúngicas. Assim, essas bactérias possuem grande importância para a biotecnologia, medicina e agricultura. Além disso, algumas espécies vivem

em associação com vários organismos superiores, para os quais desempenham importantes papéis. Este filo inclui diversas espécies que, por sua vez, adotaram diferentes estilos de vida: patógenos (*Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Propionibacterium* spp. e *Tropheryma* spp.), habitantes do solo (*Micromonospora* spp. e *Streptomyces* spp.), comensais vegetais (*Frankia* spp.) e comensais gastrointestinais (*Bifidobacterium* spp.) (BARKA et al., 2016).

Estas bactérias são conhecidas por produzir vários tipos de antibióticos, os quais possuem aplicações industriais, na agricultura, medicina e veterinária: estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, novobiocina, vancomicina, nistatina e anfotericina B (SILVA-LACERDA et al., 2016). Neste contexto, os mesmos autores acrescentam que o gênero *Streptomyces* é extremamente valioso do ponto de vista biotecnológico, pois engloba produtores de enzimas de aplicação industrial e antibióticos comerciais, como a estreptomicina. Além disso, é o gênero mais conhecido dentre as actinobactérias, incluindo mais de 3000 espécies identificadas.

O marco da quimioterapia microbiana ocorreu com o descobrimento da penicilina, substância produzida por um fungo do gênero *Penicillium*, cuja capacidade de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming, no ano de 1928. Porém, seu emprego em larga escala só teve início na década de 1940. O grande impacto do uso penicilina motivou sua produção industrial, sendo este o primeiro medicamento produzido em grande escala. Assim, iniciou-se a exploração dos micro-organismos como fonte de substâncias biologicamente ativas, principalmente na busca de novas substâncias com atividade antibiótica (TAKAHASHI e LUCAS, 2008).

Porém, em virtude de fatores diversos, dentre eles o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, observou-se o surgimento do fenômeno de resistência dos micro-organismos a tais substâncias. A resistência microbiana é uma das ameaças mais significativas para a saúde pública e está ameaçando desfazer décadas de avanços em nossa capacidade para tratar a doença através dos produtos naturais. Os efeitos colaterais e de resistência que os micro-organismos patogênicos construíram contra os antibióticos provocam falha no tratamento principal. Uma maneira de combater o problema da resistência microbiana é o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos naturais para substituição dos ineficazes (SENTHIL-RAJAN et al., 2013).

Desta forma, estudos utilizando micro-organismos oriundos do meio ambiente como produtores de metabólitos secundários são cada vez mais comuns. Sendo a Caatinga um bioma singular devido à grande variedade de paisagens, relativa riqueza biológica e endemismo (SILVA-LACERDA et al., 2016), torna-se interessante explorar tal região como fonte de substâncias de interesse biotecnológico. Marschner et al. (2004) afirmam que os solos têm comunidades microbianas distintas devido a diversos fatores, os quais incluem características físico-químicas do solo (nutrientes, teor de matéria orgânica e pH, dentre outros) e fatores ambientais (como clima e vegetação), o que pode estimular a produção de diferentes metabólitos secundários pelos micro-organismos. Esta produção ocorre em resposta às adaptações para uma função específica na natureza.

Assim, considerando o aumento da resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos existentes no mercado, observa-se uma necessidade de avaliar outros agentes com potencial atividade antimicrobiana. Neste contexto, a realização de pesquisas por novos agentes aparece como uma alternativa para este fim. Portanto, sabendo que o bioma da Caatinga possui uma microbiota variada por apresentar características únicas, torna-se interessante estudar a diversidade microbiológica desse ambiente e, conseqüentemente, seu potencial biotecnológico.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano da cepa *Streptomyces* sp. G-27 frente a micro-organismos de interesse clinic.

METODOLOGIA

- **Microrganismo**

A actinobactéria *Streptomyces sp.* G-27 foi previamente isolada de uma amostra de solo oriundo da região semiárida da Caatinga, mais especificamente da rizosfera da planta catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) (CORRÊA et al., 2014). Este microrganismo encontra-se ilustrado na Figura 1.

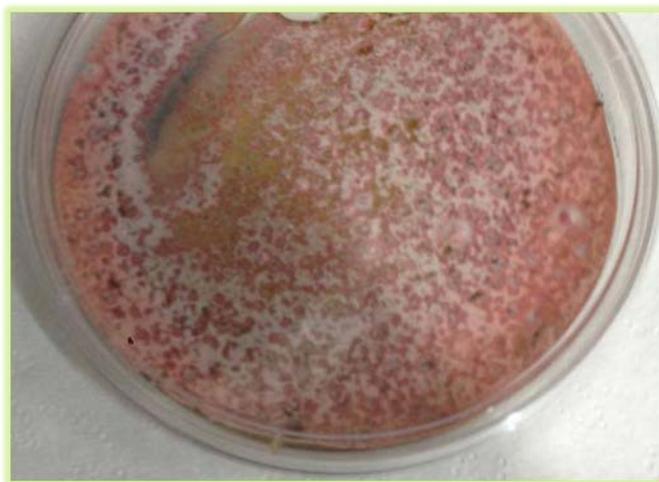


Figura 1. *Streptomyces sp.* G-27 cultivada em meio ISP-2 sólido, a 37 °C, durante 5 dias.

Streptomyces sp. G-27 encontra-se armazenado em óleo mineral, na Coleção de Microrganismos – UFPEDA, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco.

- **Reativação**

O microrganismo foi reativado em meio ISP-2 líquido, a 160 rpm, 37 °C, durante 5 dias. Após esse período, uma alíquota deste meio foi retirada com o auxílio de uma alça estéril e semeada em meio ISP-2, procedendo-se a incubação por 5 dias, a 37 °C.

- **Determinação da atividade antimicrobiana**

- **Ensaio primário**

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados, foi realizada uma seleção primária seguindo a metodologia proposta por Ichikawa et al. (1971), conhecida como “Método do Bloco de Gelose” ou “Teste de difusão em Ágar”. Neste processo, o composto bioativo se difunde no ágar.

Inicialmente, elaborou-se uma suspensão de esporos de *Streptomyces sp.* G-27 em solução salina a 0,9% estéril. Esta suspensão foi submetida à agitação em vórtex e 0,1 mL desta suspensão foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky em placa de Petri contendo o meio ISP-2. A placa foi incubada por 5 dias, a 37 °C, afim de se obter um crescimento em forma de tapete.

Decorrido este tempo, verificando o crescimento satisfatório, foram retirados blocos circulares medindo 8 mm de diâmetro, utilizando um perfurador de colônias previamente esterilizado. Estes blocos foram colocados sob os micro-organismos testes previamente plaqueados, os quais são relatados no tópico a seguir.

- Microrganismos teste

Para os testes de atividade antimicrobiana, foram utilizadas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e uma levedura. Estes microrganismos foram cedidos pela Coleção de Microrganismos - UFPEDA, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco e são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos utilizados na investigação do potencial antimicrobiano de *Streptomyces sp.* G-27.

Microrganismos-teste	
Bactérias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA-02)
	<i>Enterococcus faecium</i> (UFPEDA-138)
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA-224)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA-396)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA-416)
Levedura	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA-1007)

Para a atividade antimicrobiana, foram preparadas suspensões das bactérias e da levedura com densidade de 0,5, da Escala de McFarland. As suspensões foram semeadas em placas contendo Ágar Mueller Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud para a levedura. O teste foi realizado em triplicata.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e a 30 °C por 24-48 horas para a levedura. Após o período de cultivo, o diâmetro dos halos foi medido e os resultados foram obtidos pela média aritmética das triplicatas.

A metodologia para realização dos testes aqui descritos encontra-se esquematizada na Figura 2.

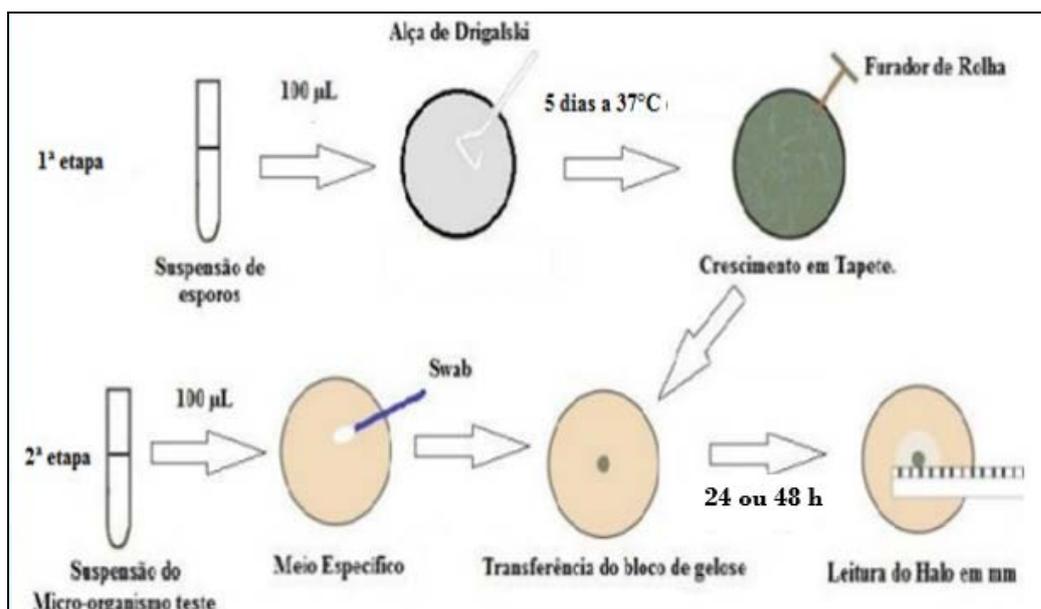


Figura 2. Esquema da realização do método "bloco de gelose".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O microrganismo *Streptomyces* sp. G-27 apresentou atividade antimicrobiana contra 5 dos 6 microrganismos testados, conforme é descrito na Tabela 2. Como é possível observar, os maiores halos de inibição foram formados contra *E. faecium* e *S. aureus*. Nas condições testadas, não houve inibição do crescimento de *P. aeruginosa*.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. G-27 frente a microrganismos de interesse clínico.

Microrganismo-teste	Halos (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	29,5
<i>Enterococcus faecium</i>	31
<i>Escherichia coli</i>	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Candida albicans</i>	16

O ensaio de bloco de gelose permitiu que o metabólito secundário produzido pela actinobactéria *Streptomyces* sp. G-27 em meio sólido se difundisse no meio de cultura, impedindo o crescimento da grande maioria dos micro-organismos-teste, mostrando-se uma metodologia efetiva para este fim.

De acordo com Mendes (2010), actinobactérias são abundantemente conhecidas devido ao seu potencial na produção de moléculas bioativas, consequência de seu metabolismo secundário, o que pode justificar os resultados obtidos neste trabalho.

Zhao et al. (2009) também executaram um teste de difusão em ágar de actinobactérias isoladas de sedimentos marinhos. Tais autores constataram que algumas cepas investigadas demonstraram vasto espectro ação: alguns isolados apresentaram atividade fungicida, à medida que outros apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. subtilis*, com halos de até 22 mm, 30 mm, 25 mm e 26 mm respectivamente. Assim, os resultados obtidos por este grupo de pesquisa então em concordância com os obtidos neste trabalho.

Ao analisar o tamanho dos halos de inibição apresentados na tabela 2, pode-se notar que a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*E. faecium* e *S. aureus*) foi bem maior do que para as Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e para a levedura (*C. albicans*). Segundo Madigan (2010), o menor percentual de atividade antimicrobiana frente a Gram-negativos é consequente da natureza complexa de sua parede celular, a qual possui uma membrana externa ao seu redor, o que confere maior resistência à ação de antibióticos, os quais não são capazes de transpassar tal barreira lipídica.

O aumento do número de casos de resistência a antibióticos por micro-organismos da prática clínica multirresistentes e a falta de opções terapêuticas a curto e médio prazo para tratamento das infecções causadas por essas por eles reforçam necessidade de se encontrar novas alternativas terapêuticas para tratar infecções. De acordo com Boucher et al. (2009), microrganismos como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp são as bactérias mais prevalentes causadoras da maioria das infecções hospitalares nos EUA e efetivamente “escapam” da ação dos antibacterianos.

Assim, várias razões podem justificar a necessidade urgente por novos agentes antibióticos: doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; altas taxas de resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo

constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso (GUIMARÃES et al., 2010). Desta forma, este estudo qualitativo realizado com diversos micro-organismos de interesse clínico pode ser considerado promissor, pois indica que o *Streptomyces* sp. G-27 é produtor de um agente antimicrobiano, o qual precisa ser isolado e identificado em estudos subsequentes.

Os resultados obtidos confirmam que as bactérias do gênero *Streptomyces* sp. são capazes de inibir o crescimento outros micro-organismos. Assim, actinobactérias do referido gênero aparecem como uma fonte útil e poderosa para a produção de metabólitos de interesse.

CONCLUSÃO

A pesquisa por novos antibióticos continua objetivando combater bactérias e fungos resistentes, melhorar as propriedades farmacológicas, combater tumores, vírus e parasitas. Desta forma, os halos de inibição do crescimento dos micro-organismos de interesse clínico demonstraram que a actinobactéria *Streptomyces* sp. G-27 aparece como possível fonte de compostos naturais bioativos, apresentando-se como uma bactéria de considerável potencial biotecnológico. Ademais, este trabalho enaltece as pesquisas realizadas com micro-organismos isolados de regiões cuja microbiota ainda é pouco explorada. Outros estudos estão em andamento visando aprimorar as condições de produção do metabólito secundário, bem como para extrair e purificá-lo.

REFERÊNCIAS

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZEL, G. P. V. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p.1-43, 2016.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L. B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no escape! an update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p.1-12, 2009.

CORRÊA, G. G. **Potencial biotecnológico de actinobactérias da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014. (Dissertação de mestrado).

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. A improvement of kasugamycin: producing strain by the Agar Piece Method and Prototroph Method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218-224, 1971.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, v. 261, p. 199-208, 2004.

MENDES, T. D. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Atinni (*Hymenoptera formicidae*)**. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010. (Dissertação de mestrado).

SENTHIL-RAJAN, D.; RAJKUMAR, M.; SRINIVASAN, R.; KUMARAPPAN, C.; ARUNKUMAR, K.; SENTHILKUMAR, K. L.; SRIKANTH, M. V. Investigation on antimicrobial activity of root extracts of *Thespesia populnea* Linn. **Tropical Biomedicine**, v. 30, n. 4, p. 570-578, 2013.

SILVA-LACERDA, G. R.; SANTANA, R. C. F.; VICALVI-COSTA, M. C. V.; SOLIDÔNIO, E. G.; SENA, K. X. F. R.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2016.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

ZHAO, X. Q.; JIAO, W. C.; JIANG, B.; YUAN, W. J.; YANG, T. H.; HAO, S. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 859-866, 2009.